

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 10-191983  
 (43)Date of publication of application : 28.07.1998

(51)Int.Cl. C12N 15/09  
 A01H 5/00  
 C07H 21/04  
 C12N 5/10  
 C12P 21/02  
 C12Q 1/68  
 // (C12N 15/09  
 C12R 1:19 )  
 (C12P 21/02  
 C12R 1:91 )

(21)Application number : 09-006793 (71)Applicant : SHOKUBUTSU KOGAKU KENKYUSHO:KK  
 (22)Date of filing : 17.01.1997 (72)Inventor : HAYASHI YASUYUKI  
 SHONO MARIKO  
 FUJIMOTO HIDEYA  
 TANAKA AKIRA

**(54) ESCHERICHIA COLI BETA GENE, PLANT OF FAMILY GRAMINEAE TRANSFORMED WITH THE GENE AND PRODUCTION OF THE PLANT**

**(57)Abstract:**

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To obtain the subject new gene producing *Oryza sativa* having resistance to higher salts or drying by removing a poly(A) addition signal-like sequence and a palindrome sequence from a gene coding a natural-type *Escherichia coli* betA protein.

**SOLUTION:** This new gene has a base sequence obtained by removing a poly(A) addition signal-like sequence and a palindrome sequence from a base sequence of a gene coding a natural-type *Escherichia coli* betA protein and codes the *Escherichia coli* betA protein. The gene highly manifests in a plant of family gramineae and the plant of family gramineae transformed by introducing the gene produces and accumulates glycine betaine, then the utility as a crop having resistance to higher salts stress or drying stress can be expected. The gene is obtained by collecting a gene coding a natural-type *Escherichia coli* betA protein and modifying its base sequence by removing a poly(A) addition signal-like sequence and a palindrome sequence by using a site-specific variation method.

**LEGAL STATUS**

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平10-191983

(43)公開日 平成10年(1998)7月28日

(51)Int.Cl.<sup>\*</sup>  
C 12 N 15/09  
A 01 H 5/00  
C 07 H 21/04  
C 12 N 5/10  
C 12 P 21/02

識別記号  
ZNA

F I  
C 12 N 15/00  
A 01 H 5/00  
C 07 H 21/04  
C 12 P 21/02  
C 12 Q 1/68

ZNAA  
A  
B  
C  
A

審査請求 未請求 請求項の数 8 OL (全 20 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平9-6793

(22)出願日 平成9年(1997)1月17日

特許法第30条第1項適用申請有り 1996年8月26日～8月30日 日本分子生物学会・日本生化学会開催の「第69回日本生化学会大会・第19回日本分子生物学会年会 合同年会」において文書をもって発表

(71)出願人 597007318

株式会社 植物工学研究所  
東京都千代田区丸の内二丁目5番2号

(72)発明者 林 泰行

神奈川県横浜市鶴見区鶴見町1000番地 株式会社植物工学研究所内

(72)発明者 庄野 真理子

神奈川県横浜市鶴見区鶴見町1000番地 株式会社植物工学研究所内

(72)発明者 藤本 英也

神奈川県横浜市鶴見区鶴見町1000番地 株式会社植物工学研究所内

(74)代理人 弁理士 遠山 勉 (外2名)

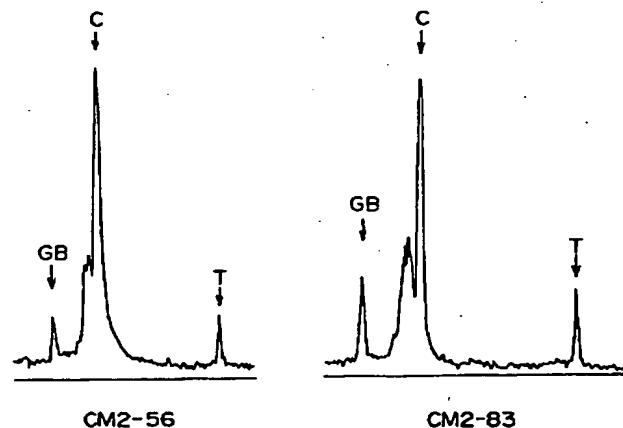
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 大腸菌betA遺伝子、該遺伝子で形質転換されたイネ科植物及びその製造方法

(57)【要約】

【課題】 ベタイン産生能を有する形質転換植物を得る。

【解決手段】 天然型betAタンパク質をコードする遺伝子の塩基配列において、poly(A)付加シグナル様配列であるATTATTはATCATCに、AATAACはAACAAACに、TTTATTはTTCATCに、AATATTはAACATCに、ATTAACはATCAACに、TATAACはTACAACに置換し、かつ、パリンドローム配列TGCCGGCTCAGCCGGCAはTGCCGGGTCAAGCGGGCAに置換する。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 天然型大腸菌betAタンパク質をコードする遺伝子の塩基配列からpoly(A)付加シグナル様配列およびパリンドローム配列が除去された塩基配列を有し、かつ、大腸菌betAタンパク質をコードする遺伝子。

【請求項2】 前記poly(A)付加シグナル様配列が、ATT ATT、AATAAC、TTTATT、AATATT、ATTAAC、及びTATAACから選ばれる請求項1記載の遺伝子。

【請求項3】 前記パリンドローム配列がTGCCGGCTCAGC CGGCAである請求項1記載の遺伝子。

【請求項4】 天然型betAタンパク質をコードする遺伝子の塩基配列において、poly(A)付加シグナル様配列であるATTATTはATCATCに、AATAACはAACAAACに、TTTATTはTT CATCに、AATATTはAACATCに、ATTAACはATCAACに、TATAACはTACAACに置換され、かつ、パリンドローム配列TGCCGG CTCAGCCGGCAはTGCCGGGTCAAGCGGGCAに置換されることを特徴とする請求項1記載の遺伝子。

【請求項5】 配列表の配列番号1に記載の塩基配列で表されることを特徴とする請求項4記載の遺伝子。

【請求項6】 請求項1～5のいずれか一項に記載の遺伝子が導入されていることを特徴とするベクター。

【請求項7】 請求項6に記載のベクターをイネ科植物由来のプロトプラストに導入し、このプロトプラストからコロニーを形成させた後、該コロニーから植物体を再生させて得られたイネ科植物。

【請求項8】 請求項6に記載のベクターおよびイネ科植物由来のプロトプラストを液体培地に懸濁し、電気パルスを印加して該ベクターを導入した後、イネ培養細胞を含有する培地で培養しコロニーを形成させ、該コロニーから植物体を再生させることを特徴とする、大腸菌betAタンパク質を產生するイネ科植物の製造方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、大腸菌由来の適合溶質合成遺伝子、該遺伝子を導入して得られたイネ科植物及びその製造方法に関し、詳細には適合溶質として知られるグリシンベタイン（以下、「ベタイン」と略す）の生合成酵素タンパク質をコードする合成遺伝子及び当該遺伝子を導入することによる耐塩性・耐乾燥性イネ科植物の製造方法に関する。

## 【0002】

【従来の技術及び発明が解決しようとする課題】 近年、生物が高塩類環境や乾燥に適応する機構として、適合溶質（低分子有機化合物、浸透圧調節物質）に関する研究が活発に進められている。例えば、高塩類環境下で、大腸菌は適合溶質として4級アンモニウム化合物のベタインやアミノ酸のプロリンを、細胞内に高濃度蓄積することによって細胞内の浸透圧を高め、環境に適応する。また、耐塩性・耐乾燥性植物も、ベタイン、プロリン、ないしはジメチルスルフォニオプロピオネートのような3

級スルフォニウム化合物、マンニトールのような糖アルコールなどを細胞質に蓄積し、塩類ストレスや乾燥ストレスに適応することが明らかとなった。一方、イネ科の重要な作物、例えばイネ、普及種のトウモロコシなどは、これらの適合溶質を蓄積する能力を欠くために、高塩類環境や乾燥に弱いと考えられている。

【0003】 適合溶質のなかでも、ベタインは多くの植物種で利用されており、また植物細胞内の浸透圧調節以外の機能、即ち、葉緑体のタンパクの保護作用（野村ら、日本植物生理学会1996年度年会講演要旨集, p146）の解明がすすんでいる。そこで、ベタイン生産能のない植物にベタイン生合成に関わる酵素タンパク質の遺伝子を導入することによる耐塩性・耐乾燥性作物の育種に関する研究がさかんになってきた。例えば、林らは、放線菌が持つコリンオキシダーゼ遺伝子をクローニングし、アラビドブシスで発現させ、ベタイン生産能のある形質転換体植物を得ることに成功している（日本植物生理学会1996年度年会講演要旨集, p146）。コリンオキシダーゼは、前駆体であるコリンからベタインへ一段階で転換する酵素であるが、その反応の際に、植物細胞にとって極めて毒性の高い過酸化水素をベタインと等量産生するという問題がある。

【0004】 大腸菌ではベタインは、コリンからベタインアルデヒドへ転換するコリン脱水素酵素と、ベタインアルデヒドからベタインへ転換するベタインアルデヒド脱水素酵素の2つの酵素によって產生される。コリン脱水素酵素はbetA遺伝子にコードされているが、この遺伝子にコードされるタンパクにはベタインアルデヒド脱水素酵素活性もあることが報告されている。野村らは、淡水性ラン藻に大腸菌のbetA遺伝子を導入し、耐塩性の強化に成功した（Plant Physiol. 107, 703-708 (1995)）。また、Liliusらは、betA遺伝子をタバコに導入することでストレス耐性の形質転換体植物を得たと報告している（Bio/Technology, 165(3), 849 (1996)）。しかし、betA遺伝子が植物細胞中で発現したという証拠がなく、ベタインが蓄積したことでも証明できていない。さらに、農業上重要なイネ科作物においてbetA遺伝子を導入し発現させ、ベタイン生産能のある形質転換体を得たという報告は未だなされていない。

## 【0005】

【課題を解決するための手段】 本発明者らは、betA遺伝子を詳細に解析した結果、遺伝子配列中に植物、とくにイネ科植物での遺伝子発現に好ましくない配列が存在することを見出した。即ち、①転写レベルでの発現を妨げる6カ所のpoly(A)付加シグナル様配列、②翻訳レベルでの発現を妨げるパリンドローム配列である。さらに、betA遺伝子には、イネ科植物遺伝子ではほとんど使用されないコドンが存在することを見出した。そこで、当該遺伝子のイネ科植物での発現を検討した結果、特定の改変遺伝子が、遺伝子導入によりイネ科植物で高発現し、

beta遺伝子産物の酵素タンパク質をコードし、植物体内にベタインを蓄積させることを初めて見出し、本発明を完成するに至った。

【0006】即ち本発明の要旨は、植物中で遺伝子発現させる際に妨げとなる当該遺伝子中のpoly(A)付加シグナル様配列、及びパリンドローム配列がなくなるように改変されたbetA遺伝子（以下、「改変型betA遺伝子」という）、当該遺伝子が導入されたベクター、当該ベクターで形質転換されたイネ科植物およびその製造法に存する。

【0007】本発明において対象となる植物はイネ科植物であり、イネ科に属するものであれば特に制限はされない。具体的にはイネ、ムギ（コムギ、オオムギ、ライムギ等）、ヒエ、アワ、シバ、トウモロコシ等が挙げられ、本発明においては特にイネが好ましい。

【0008】

【発明の実施の形態】以下、本発明につき詳細に説明する。

【0009】<1>本発明の改変型betA遺伝子

本発明の改変型betA遺伝子は、天然型大腸菌betAタンパク質をコードする遺伝子の塩基配列から、poly(A)付加シグナル様配列およびパリンドローム配列が除去された塩基配列を有し、かつ、大腸菌betAタンパク質をコードする遺伝子である。poly(A)付加シグナル様配列としてはATTATT、AATAAC、TTTATT、AATATT、ATTAAC、及びTATAACが、パリンドローム配列としてはTGCCGGCTCAGCCGGCAが挙げられる。

【0010】天然型大腸菌betAタンパク質をコードする遺伝子は、Molecular Microbiology, 5(5), 1049 (1991)に記載されている。その塩基配列は、配列表の配列番号2に示すような配列であり、配列番号3に示すアミノ酸配列を有するタンパク質をコードしている。尚、配列番号2に示される塩基配列では、翻訳開始コドンの前にBamHI切断部位の6塩基GGATCCが、終始コドンの27塩基後にSacI切断部位の6塩基GAGCTCが、各々付加され、翻訳開始コドンはTTGからATGに置換されている。

【0011】本発明の遺伝子は、betAタンパク質と機能的に同等のタンパク質をコードし、かつ、イネ科植物内で天然のbetA遺伝子よりも高いレベルで発現されるように、化学的、酵素学的に改変される。ここで、betAタン

パク質と機能的に同等なタンパク質とは、betA遺伝子のコードするタンパク質、すなわち配列表の配列番号3に示すアミノ酸配列を有するタンパク質、又はこのアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、コリンからベタインを生成する活性を有するタンパク質である。このようなbetAタンパク質と機能的に同等なタンパク質をコードするDNAは、例えば野生型betA遺伝子を基に部位特異的変異法によって取得することができる。また、野生型betA遺伝子又はこれを有する細胞に変異処理を行って得られるDNA若しくは細胞微生物から、配列番号2に記載の塩基配列を有するDNAとストリンジエントな条件下でハイブリダイズするDNAであって、コリンからベタインを生成する活性を有するタンパク質を選択することによっても、欠失、置換若しくは付加された塩基配列を有する遺伝子を得ることができる。ここでいう「ストリンジエントな条件」とは、いわゆる特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいう。この条件を明確に数値化することは困難であるが、一例を示せば、相同性が高い核酸同士、例えば、60%以上、好ましくは80%以上の相同性を有するDNA同士がハイブリダイズし、それより相同性が低い核酸同士がハイブリダイズしない条件が挙げられる。

【0012】本発明の改変型betA遺伝子は、天然のbetA遺伝子がコードするアミノ酸配列又はbetAタンパク質と機能的に同等のタンパク質のアミノ酸配列を基にして、これらのアミノ酸配列を変化させることなく、それぞれのアミノ酸のコドンの種類だけを変化させるように改変される。具体的には、次の2点を満たすように改変される。

【0013】①遺伝子転写の妨げとなる天然のbetA遺伝子中のpoly(A)付加シグナル様配列を、転写の妨げとなるないような他の配列であって、アミノ酸置換を起こさないような配列に置換する。置換後の配列として、具体的には表1に示す配列が挙げられる。これらのpoly(A)付加シグナル様配列のうち、少なくとも1箇所、好ましくは2箇所以上、特に好ましくは全てを置換する。

【0014】

【表1】

置換前の配列	配列番号2における位置	置換後の配列	配列番号1における位置
ATTATT	25～30	ATCATC	19～24
AATAAC	223～228	AACAAAC	217～222
TTTATT	1048～1053	TTCATC	1042～1047
AATATT	1081～1086	AACATC	1075～1080
ATTAAC	1111～1116	ATCAAC	1105～1110
TATAAC	1117～1122	TACAAAC	1111～1116

【0015】②遺伝子の翻訳の妨げとなる天然のbetA遺伝子中のパリンドローム配列TGCGGGCTCAGCCGGCA (配列表配列番号2において塩基番号33～49)は、パリンドロームを形成せず、かつ、コードするアミノ酸の置換が起こらないような配列、例えばTGCGGGGTCAAGCGGGCA (配列表配列番号1において塩基番号27～43)に置換する。

【0016】上記のような置換型betA遺伝子は、例えば、天然型beta遺伝子を錠型とし、置換しようとする領域を含む63～85塩基程度の合成1本鎖オリゴヌクレオチド (以下、「プライマー」と略す)を用いたポリメラーゼチャインアクション法 (以下、「PCR」と略す (Am. J. Hum. Genet., 37, 172, 1985))による増幅反応を行うことによって、取得することができる。オリゴヌクレオチドの合成は、定法によって行えやすく、その際、プライマー内のアミノ酸のコドンは、イネ科植物でのコドン使用率が1%以下の場合、最大使用率のコドン等、使用率の高いコドンに変えることが好ましい。PCRに用いるプライマーは、betA遺伝子の塩基配列を基に、上記の置換を含むように設計したものを用いればよい。プライマーの配列と、PCR法による変型betA遺伝子の取得法を、以下に例示する。

【0017】まず、天然型betA遺伝子の配列のうち、5'末端部分の改变したい塩基配列を含む約300 bpの配列をはさんで63 bpの5'側プライマー① (配列番号6) と63 bpの3'側プライマー② (配列番号7) を合成し、天然betA遺伝子を錠型としてPCRによって2本鎖DNA (配列番号4において7～290、配列番号1において塩基番号1～275に相当する)を増幅する。以下、このDNA断片を、「DNA断片A」という。尚、プライマー①の5'末端側には、開始コドンの上流に、グルタミン合成酵素の葉緑体移行配列の一部をコードする塩基配列と制限酵素の認識配列 (GGATCC) が付加されている。

【0018】次に、85 bpの2本のプライマー④ (配列番号9) 及びプライマー⑤ (配列番号10) を、それぞれの3'末端で約15 bp相補鎖を形成するように合成し、このプライマーを用いたPCRにより、156 bpの2本鎖DNA (配列番号5において78～233、配列番号1において塩基番号1010～1165に相当する)を増幅する。次に得られたDNAとプライマー③ (配列番号

8) を用いてPCR反応を行い、226bpの2本鎖DNA (配列番号5において8～233、配列番号1において塩基番号940～1165に相当する)を得る。以下、このDNA断片を、「DNA断片B」という。

【0019】上記のようにして得られるDNA断片A及びDNA断片Bは、マルチプルクローニングサイトを有する大腸菌ベクター、例えばpCRTMII (Invitrogen社製、TA Cloning Kit) にクローニングされる。この後、クローニングされた各々のDNA断片はSangerら、(Proc. Natl. Acad. Sci., 74, 5463-5467, 1977)のジテオキシ法等によって配列を決定、確認される。各々のDNA断片は定法により、両端に有する制限酵素部位を利用して制限酵素で切断後、天然betA遺伝子中の各々のDNA断片が対応する部分と置き換えることで最終的にbetAタンパク質をコードする全長の構造遺伝子となる。その一例を、配列表の配列番号1に示す。尚、この塩基配列においては、表2に示すように、イネ科植物遺伝子で使用頻度の低いコドンが、アミノ酸の置換を伴わないように他の等価のコドンに置換されている。本発明においては、これらのコドンのうち、好ましくは18箇所以上、より好ましくは20箇所以上、特に好ましくは全てを置換する。

【0020】

【表2】

表2

コドンの位置	置換前のコドン	置換後のコドン
3	TTT	TTC
80	GCA	CCC
82	GCT	GGC
83	AAA	AAC
86	GGT	GGC
87	GCA	GGC
325	AAA	AAC
327	GGT	GGC
332	TTT	TTC
335	ACT	ACC
337	GTT	GTC
338	GGT	GGC
343	TTT	TTC
344	GAA	GAG
345	GCA	GGC
346	GGT	GGC
347	GCA	GGC
352	CGT	CGC
354	GAA	GAG
363	CAT	CAC
366	CCA	CCG
367	GTA	GTC
375	AAT	AAC
376	GCA	GCC
378	AAA	AAG
381	GGT	GGC

## 【0021】&lt;2&gt;本発明のベクター

本発明のベクターは、上記のようにして得られる改変型betA遺伝子が導入されたベクターである。改変型betA遺伝子は、イネ科植物中で発現するプロモーターとターミネーター、もしくは必要に応じてイントロンを有するプラスミドベクターに組み込まれる。

【0022】利用するプロモーターとして、例えばCaMV 35S(pBI221: EMBO J., 6, 3901-3907, 1987)等のカリフラワーモザイクウイルス由来のプロモーター、rbcS(ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase)、Cab(chlorophyll a/b binding protein)等(Science, 244, 174 (1991)、植物中で発現することが確認されたプロモーターが挙げられる。また、構造遺伝子の上流には、蛋白質を葉緑体に移行させるアミノ酸配列(Plant Molecular Biology, 13, 611 (1989))もしくはミトコンドリアに移行させるアミノ酸配列(Plant Cell Physiol. 34(2):345(1993))を、betAタンパク質との融合タンパクを形成するよう付加し、betAタンパク質を葉緑体もしくはミトコンドリアに局在させるか、移行配列は付けずに発現されたbetAタンパク質が細胞質に存在するようにする。

【0023】ターミネーターとしては、例えばカリフラワーモザイクウイルス由来のターミネーター、NOS(ノバ

リン合成酵素)遺伝子由来のターミネーター等があげられる。また、プロモーターと構造遺伝子の間にイントロンを配するベクターも高発現ベクターとして利用でき、イントロンとしては、例えばトウモロコシAdh1(アルコールデヒドゲナーゼ遺伝子)の第一イントロン(Genes & Development, 1, 1183-1200, 1987)、ヒマCat(カタラーゼ遺伝子)の第一イントロン(Tanaka et al., Nucleic Acids Research, 18, 6767-6770, 1990)等があげられる。

【0024】本発明においては更に、ハイグロマイシンフォスフォトランスフェラーゼ遺伝子、ネオマイシンフォスフォトランスフェラーゼ遺伝子、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子、 $\beta$ -グルクロニダーゼ遺伝子等から選ばれる2つ以上の外来遺伝子を使用し、かつその1つは目的とするコロニーを選択する際に有効な、いわゆる選択マーカー遺伝子を使用するのが好ましい。かかる選択マーカー遺伝子としては、ハイグロマイシンフォスフォトランスフェラーゼ遺伝子が好ましい。

【0025】<3>本発明のイネ科植物及びその製造法  
本発明のイネ科植物は、上記ベクターをイネ科植物由来のプロトプラストに導入し、このプロトプラストからコロニーを形成させた後、該コロニーから植物体を再生させて得られる。また、本発明のイネ科植物の製造方法は、上記ベクターおよびイネ科植物由来のプロトプラストを液体培地に懸濁し、電気パルスを印加して該ベクターを導入した後、イネ培養細胞を含有する培地で培養しコロニーを形成させ、該コロニーから植物体を再生させることを特徴とする。

【0026】本発明においては、選択マーカー遺伝子と改変型betA遺伝子を同一のプラスミド中に有するものを使用してもよいし、選択マーカー遺伝子を有するプラスミドと改変型betA遺伝子を有するプラスミドとを併用してもよい。ベクターはイネ科植物を形質転換するのに用いられる。すなわち、イネ科植物由来のプロトプラストを液体培地に懸濁し、電気パルスを印加して当該ベクターを導入した後、イネ培養細胞を含有する培地で培養しコロニーを形成させ、該コロニーから植物体を再生させる方法である(Shimamoto et al., Nature, 337, 274-276, 1989)。

【0027】プロトプラストは次のようにして調製することができる。例えば、日本晴、コシヒカリ、ササニシキ等の栽培イネの完熟及び未熟種子、葉鞘、根の組織に由来するサスペンション細胞あるいはカルスを液体培地で培養した後、常法に従い、例えばセルラーゼやマゼロザイム等の細胞壁分解酵素を含む酵素液中25~30°C, 0~50 r.p.m.の条件で3~16時間程度酵素処理する。酵素処理終了後、濾過して未消化物を除き、ろ液に2~5倍量のKMC液(0.118M 塩化カリウム, 0.0817M 塩化マグネシウム, 0.085M 塩化カルシウム, pH6.0)(Theo

r. Appl. Genet., 53, 57-63, 1978)等を加え遠心分離して、精製されたプロトプラストを得ることができる。

【0028】上記のようにして調製した改変型betA遺伝子を含む発現ベクター、例えば1-100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ と、上記植物由来のプロトプラスト、例えば $(2\sim10)\times10^6$ 個/ $\text{ml}$ とを、30~200mM塩化カリウム、0~50mM塩化マグネシウム、0.2~0.6Mマニトール、0.1%MESを含むpH5.8の緩衝液中に懸濁し、これに電気パルスを印加してプラスミドをプロトプラスト中に導入する。電気パルス処理は、100~1000  $\mu\text{F}$ のコンデンサーを用いて得られる200~1000V/cmの初期電圧の直流パルスで、パルス幅1~50msec程度の条件で印加するのが好適である。(特開平1-181791号公報参照)。

【0029】上述のように電気パルス処理したプロトプラストを、例えばR2培地(Plant. Cell. Physiol., 14, 1113, 1973)の無機成分とMS培地(Murashige and Skoog, 15, 473-497, 1962)のビタミン混合液を含む液体培地(R2/MS)あるいはMS培地で、好ましくは窒素源として硝酸カリウムを0.2~0.5%含有する培地に懸濁し、これを1.0~3.0%程度のアガロースを含むR2/MSあるいはMS培地等と等量ずつ混ぜ、速やかにシャーレ中に広げて薄く固める。この時のプロトプラストの濃度は約(5~50)×105個/ $\text{ml}$ となるようにするのが好ましい。

【0030】続いて固化したアガロースを5~20mm大の大きさに切断し上記液体培地上で培養する。その際、イネ科植物由来のプロトプラストを使用した場合には、好ましくは培地中にイネ培養細胞を100~300mgFW/シャーレ程度共存させ、20~50r.p.mの回転でゆっくり振とうしながら、暗条件下23~27°Cで培養する。イネ培養細胞と共に存する方法は上記の方法のほかに、プロトプラストを含む液体培地を、底にメンブレンフィルターを設けた容器内に入れ、その容器をイネ培養細胞と共に液体培地を入れたシャーレに浸して共存させる方法がある。ここに示すイネ培養細胞は、旺盛に分裂している細かい細胞塊から成る物が好ましい。このような培養細胞は、例えばイネ植物の種子、茎、根あるいは薬より得られたカルスを液体培地中に継代して分裂速度の早い細胞を選抜していく等の公知の方法に準じて容易に得られる。

【0031】培養後3~4週間で、0.5~1mm程度のコロニーが形成される。その際、ベクターに選択マーカー遺伝子としてハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子(hph)を導入しておいた場合、培養開始後7~20日にハイグロマイシンを10~100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 程度培養液中に添加し、さらに培養を続けると目的とする形質転換細胞の選択を効率よく行うことができる。次いでこのコロニーを増殖培地、例えばR2培地に植物ホルモン、例えば2,4-ジクロロフェノキシ酢酸(2,4-D)を2mg/l程度、アガロースを0.1~1.0%加えた寒天培地上で2~4週間、照明下(1,000~4,000lux)、23~27°Cで培養し直径3~6mmのカルスを得る。個々のカルスを単独に分離し、さらに、例

えば選択マーカー遺伝子としてhph遺伝子を導入した場合には、ハイグロマイシン20~50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ を含む同増殖培地に置床して培養し、ハイグロマイシン耐性を確認する。

【0032】このカルスを、例えば0.5~1.5%アガロースを含むR2/MS培地(但しホルモン無添加あるいはサイトカイニンを1~10mg/l添加)で23~27°C, 2,000~4,000luxの条件下で培養すれば2~10週間で不定胚または不定芽の形成が認められる。さらに2~3週間ホルモンを含まないR2/MS培地等で培養することにより、移植可能な幼植物体が得られる。こうして得られた幼植物体は、バーミュキュライト等に移植して成長させると目的とする形質転換されたイネの植物体を得ることができる。

【0033】形質転換細胞、もしくは形質転換植物に遺伝子が組み込まれていることは、これらからDNAを、例えばMol. Gen. Genet., 211, 27, 1988に準じた方法で単離し、PCR法(Am. J. Hum. Genet., 37, 172, 1985)もしくはサザン法(J. Mol. Biol., 98, 505, 1980)により確認できる。また、形質転換細胞が植物ゲノムに組み込まれた改変型betA遺伝子を発現していることは、例えば、改変型betA遺伝子の配列又はその一部をプローブとしたノーザン法(Thomas, P. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 77, 5201, 1980)、導入した遺伝子産物(betAタンパク質)に対する抗血清を用いたウエスタン法(Towbin et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 76, 4350, 1979)により明らかにできる。導入した遺伝子の翻訳産物であるbetAタンパク質の酵素活性は、長沢らの方法(Agr. Biol. Chem., 40(10), 2077 (1976))により測定できる。形質転換イネ植物体中のベタイン含量は荒川らの方法(Plant Physiol. 29, 1315-1321 (1988))に従って<sup>1</sup>H-NMRにより検出・定量できる。

#### 【0034】

【実施例】以下、本発明につき実施例を挙げて具体的に説明するが、その要旨を越えない限り以下の実施例に限定されるものではない。

#### 【0035】

【実施例1】未改変betA遺伝子を含む植物用発現ベクターの構築、betA構造遺伝子の化学的、酵素的合成、及びベクターへの結合

(1) 未改変betA遺伝子(配列表配列番号2)を含む植物用発現ベクターの構築カリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーターと、ヒマカタラーゼ遺伝子のイントロンと、イネのグルタミン合成酵素の葉緑体移行配列をコードするDNAと、 $\beta$ -グルクロニダーゼ(GUS)構造遺伝子とをこの順序で含み、葉緑体移行配列と $\beta$ -グルクロニダーゼが融合タンパクのかたちで発現するプラスミドGSC-GUS(日本農芸化学会誌, 69(5), 11-13, (1995))を、10mM Tris-HCl(pH7.5), 7mM MgCl<sub>2</sub>, 7mM 2-メルカプトエタノール, 20mM KCl(以後、この組成の反応液をLow bufferと呼ぶ)100  $\mu\text{l}$ 中で制限酵素SacI 2u $\text{u}$

itsで切断したのち、10mM Tris-HCl(pH7.5)、7mM MgCl<sub>2</sub>、7mM 2-メルカプトエタノール、150mM KCl(以後、この組成の反応液をHigh bufferと呼ぶ) 100μl中で制限酵素BamHI 2unitsで切断し、GUS遺伝子を取り除いた。

【0036】次いで、betA遺伝子(Molecular Microbiology, 5(5), 1049 (1991))の翻訳開始コドンの前にBamHI切断部位の6塩基GGATCCを付加し、終始コドンの27塩基後にSacI切断部位の6塩基GAGCTCを付加したbetA遺伝子(翻訳開始コドンはTTGからATGに変えてある)(配列の配列番号2)を、Low buffer 100μl中で制限酵素SacI 2unitsで切断したのち、High buffer 100μl中で制限酵素BamHI 2unitsで切断して得たDNA断片を、先のプラスミドGSC-GUSのGUS遺伝子を取り除いた部分にライゲーションキット(Ligation kit、宝酒造(株))を用いて繋ぎ込み、プラスミドpbet/chl(図1)を得た。

#### 【0037】(2) PCR用プライマーの調製

前述のようにして設計されたbetA遺伝子の塩基配列(配列の配列番号1)にしたがって、DNA断片A(配列の配列番号4)、DNA断片B(配列の配列番号5)をPCRによって増幅するためのプライマーに用いるオリゴヌクレオチド(配列の配列番号6~10)を合成した。オリゴヌクレオチドの調製は、Matteucciら(1981) J. Am. Chem. Soc. 103, 3185-3192およびBeaucageら、(1981) Tetrahedron Lett. 22, 1859-1862に記載されている一般的な手法にしたがって実施した。オリゴヌクレオチドはすべて、Applied Biosystems 391形DNA合成装置を用いて、固相ホスホアミダイトトリエステル・カップリング法で調製した。オリゴマーの個体担体からの脱保護と分離は、標準法に従い28%アンモニア水を用いて行った。粗製オリゴヌクレオチド混合物は、オリゴヌクレオチド精製カートリッジ(OPCカラム、Applied Biosystems)を用い、Mcbridgら(1988) Biotechniques, 6; 362-367)に記載されているのと同様にして精製した。

【0038】(3) PCR法による2本鎖DNA化置換しようとするpoly(A)付加シグナル様配列、及びイネ科植物遺伝子で使用頻度の低いコドンの位置は、前記表1、2に示したとおりである。また、パリンドローム配列は、配列の配列番号2において塩基番号33~49(TGCCGCTCAGCCGGCA)に存在する。

【0039】DNA断片Aは、両端にBamHI, BclI部位を持つ284bpの断片で、これは前述のように、2本のオリゴヌクレオチド①②(配列の配列番号6、7)をプライマーとして用い、天然のbetA遺伝子を錆型としてPCR反応を行うことにより増幅された(配列の配列番号4)。PCRはプライマー濃度10μM, 10mM Tris-HCl(pH 8.3), 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 50mM KCl, 0.005% NP-40, 0.001% Gelatin, dATP, dGTP, dCTP, dTTP, 各200μM, AmpliTaq<sup>R</sup> DNA polymerase (PERKIN-ELMER社) 5 units, 全100μlの反応

液(以後(3)の項におけるPCR法による2本鎖DNA化には、プライマーの種類と錆型DNAが異なる以外は同じ組成の反応液を用いて行った。)をDNAサーマルサイクラー(MJ RESEARCH社)を用いて、94℃, 1 min., 54℃, 2 min., 72℃, 3 min.からなるサイクルを30回繰り返し反応させて行った。

【0040】DNA断片Bは、両端にPstI, BglII部位をもつ226bpの断片で、これは3本のオリゴヌクレオチドプライマー③④⑤(配列の配列番号8、9、10)を用いたPCRによって増幅された。DNA断片Bは、まずプライマー④および⑤を用いてPCRを行い、156bpのDNAを合成した。PCRは94℃, 1 min., 45℃, 1 min., 72℃, 2 min.の条件で5回繰り返し、次に94℃, 1 min., 60℃, 1 min., 72℃, 2 min.の条件で20回繰り返し反応させて行った。続いて、前記のようにして増幅された156bpのDNA 5μlとプライマー③を用いて1回目と同じ反応条件でPCRを行い226bpのDNAを合成した(配列の配列番号5)。

【0041】プラスミドの構築は図1~4に従って行った。プラスミドpbet/chlを10mM Tris-HCl(pH7.5), 7mM MgCl<sub>2</sub>, 7mM 2-mercaptopropanoic acid, 60mM NaCl(以後この組成の反応液をMedium bufferと呼ぶ) 100μl中で制限酵素BclI 2unitsで切断したのちHigh buffer 100μl中で制限酵素BamHI 2 unitsで切断し、0.7% Seakem GTG Agarose(FMC社), 1×TBE緩衝液で電気泳動し4.9 kbpのDNAバンドを切り出した。このバンドを透析チューブに入れ、0.5×TBE緩衝液中で135mA定電流を流し、ゲルからDNAを泳動して回収した。得られた400μlのDNA溶液に40μl 3M NaOAcおよび1000μl 100%エタノールを加え、15000 rpmで15分遠心し目的の4.9 kbp DNA断片C(図1)を精製した。

【0042】ついで、DNA断片Aが挿入された大腸菌ベクターpCR™II/AをMedium buffer 100μl中で制限酵素BclI 2 unitsで切断したのちHigh buffer 100μl中で制限酵素BamHI 2 unitsで切断し、4% NuSieve GTG Agarose(FMC社), 1×TBE緩衝液で電気泳動し278 bpのDNAバンドを切り出した。このバンドを透析チューブに入れ、0.5×TBE緩衝液中で135mA定電流を流し、ゲルからDNAを泳動して回収した。得られた400μlのDNA溶液に40μl 3M NaOAcおよび1000μl 100%エタノールを加え、15,000 rpmで15分遠心し目的の278 bp DNA断片A'(図1)を精製した。精製したDNAそれぞれ約1/10量をT4 DNAリガーゼを利用したDNAligation Kit(Takara社)を用いてキットのマニュアルに従って全50 μlの反応系で結合し、大腸菌株DH5<sup>a</sup>に形質転換しクロラムフェニコールで選抜することでDNA断片A相当部分が置き換わったプラスミドpbet/chl/M1(図1)が導入された菌株を得た。この菌を培養しプラスミドpbet/chl/M1を精製した。

【0043】プラスミドpbet/chl/M1をLow buffer 100

$\mu$ l中で制限酵素SacI 2 unitsで切断したのちHigh buffer 100  $\mu$ l中で制限酵素SalI 2 unitsで切断し、1% Sea kem TG Agarose(FMC社), 1×TBE 緩衝液で電気泳動し1.9 kbp のDNAバンドを切り出し、透析チューブに入れ、0.5×TBE 緩衝液中で135mA定電流を流し、ゲルからDNAを泳動して回収した。得られた400  $\mu$ lのDNA溶液に40  $\mu$ l 3M NaOAcおよび1000  $\mu$ l 100% エタノールを加え、15,000 rpmで15分遠心し目的の1.9 kbp DNA断片D(図2)を精製した。大腸菌ベクターpBluescript R II KS (STRATAGENE社)についても同様にして制限酵素SalI, SacIで切断し精製した2.9 kbp DNA断片E(図2)を得た。精製したDNAそれぞれ約1/10量をT4 DNAリガーゼを利用したDNA Ligation Kit(Takara社)を用いてキットのマニュアルに従って全50  $\mu$ lの反応系で結合し、大腸菌株DH5 $\alpha$ に形質転換しアンピシリンで選抜することで変異させたbetA構造遺伝子部分が挿入されたプラスミドpBS/bet/M1(図2)が導入された菌株を得た。この菌を培養しプラスミドpBS/bet/M1を精製した。

【0044】プラスミドpBS/bet/M1をLow buffer 100  $\mu$ l中で制限酵素SacI 2 unitsで切断したのちHigh buffer 100  $\mu$ l中で制限酵素PstI 2 unitsで切断し、1% Sea kem GTG Agarose(FMC社), 1×TBE 緩衝液で電気泳動し4 kbp のDNAバンドおよび742 bpのDNAバンドを切り出し、それぞれ透析チューブに入れて0.5×TBE 緩衝液中で135mA定電流を流し、ゲルからDNAを泳動して回収した。得られた400  $\mu$ lのDNA溶液に40  $\mu$ l 3M NaOAcおよび1000  $\mu$ l 100% エタノールを加え、15,000 rpmで15分遠心し目的の4 kbp DNA断片F(図3)と742 bpのDNA断片G(図3)を精製した。742 bpのPstI-SacI断片GはさらにHigh buffer 100  $\mu$ l中で制限酵素Bgl I 2 unitsで切断し、4% NuSieve GTG Agarose(FMC社), 1×TBE 緩衝液で電気泳動し542 bpのバンドを切り出し、透析チューブに入れ、0.5×TBE緩衝液中で135mA定電流を流し、ゲルからDNAを泳動して回収した。得られた400  $\mu$ lのDNA溶液に40  $\mu$ l 3M NaOAcおよび1ml 10% エタノールを加え、15,000 rpmで15分遠心し目的の542 bp DNA断片H(図3)を精製した。

【0045】ついで、DNA断片Bが挿入された大腸菌ベクターpCRTMII/B(図3)をHigh buffer 100  $\mu$ l中で制限酵素PstI 2 unitsで切断したのちHigh buffer 100  $\mu$ l中で制限酵素Bgl I 2 unitsで切断し、4% NuSieve GTG Agarose(FMC社), 1×TBE緩衝液で電気泳動し205 bpのDNAバンドを切り出し、透析チューブに入れ、0.5×TBE 緩衝液中で135mA定電流を流し、ゲルからDNAを泳動して回収した。得られた400  $\mu$ lのDNA溶液に40  $\mu$ l 3M NaOAcおよび1ml 100% エタノールを加え、15,000 rpmで15分遠心し、目的の205 bp DNA断片B'(図3)を精製した。

【0046】205 bpのPstI-Bgl I断片B' と542 bpのBgl II-SacI断片Hを、T4 DNAリガーゼを利用したDNA Ligation Kit(Takara社)を用いてキットのマニュアルに従って全50  $\mu$ lの反応系で結合したのちエタノール沈殿により精製し、次いでそれと4 kbpのDNA断片Fを、T4 DNAリガーゼを利用したDNA Ligation Kit(Takara社)を用いてキットのマニュアルに従って全50  $\mu$ lの反応系で結合した。この反応液を用いて大腸菌株DH5 $\alpha$ に形質転換しアンピシリンで選抜することで変異の入ったbetA構造遺伝子部分が挿入されたプラスミドpBS/bet/M2(図3)が導入された菌株を得た。この菌を培養しプラスミドpBS/bet/M2を精製した。

【0047】プラスミドpBS/bet/M2をLow buffer 100  $\mu$ l中で制限酵素SacI 2 unitsで切断したのちHigh buffer 100  $\mu$ l中で制限酵素SalI 2 unitsで切断し、1% Sea kem GTG Agarose(FMC社), 1×TBE 緩衝液で電気泳動し、1.9 kbp のDNAバンドを切り出し、透析チューブに入れ、0.5×TBE 緩衝液中で135mA定電流を流し、ゲルからDNAを泳動して回収した。得られた400  $\mu$ lのDNA溶液に40  $\mu$ l 3M NaOAcおよび1ml 100% エタノールを加え、15,000 rpmで15分遠心し目的のDNA断片I(図4)を精製した。

【0048】プラスミドpbet/chlをLow buffer 100  $\mu$ l中で制限酵素SacI 2 unitsで切断したのちHigh buffer 100  $\mu$ l中で制限酵素SalI 2 unitsで切断し、1% Sea kem GTG Agarose(FMC社), 1×TBE 緩衝液で電気泳動し3.5 k bp のDNAバンドを切り出し、透析チューブに入れ、0.5×TBE 緩衝液中で135mA定電流を流し、ゲルからDNAを泳動して回収した。得られた400  $\mu$ lのDNA溶液に40  $\mu$ l 3M NaOAcおよび1ml 100% エタノールを加え、15,000 rpmで15分遠心し目的のDNA断片J(図4)を精製した。

【0049】変異の入ったbetA構造遺伝子の1.9 kbp Sal II-SacI断片Iとプラスミドpbet/chlから切り出された3.5 kbp Sal II-SacI断片JをT4 DNAリガーゼを利用したDNA Ligation Kit(Takara社)を用いてキットのマニュアルに従って全50  $\mu$ lの反応系で結合し、この反応液を用いて大腸菌DH5 $\alpha$ に形質転換しクロラムフェニコールで選抜することで変異の入ったbetA構造遺伝子部分が挿入されたプラスミドpbet/chl/M2(図4)が導入された菌株を得た。この菌を培養しプラスミドpbet/chl/M2を精製した。

【0050】

【実施例2】合成betA遺伝子の植物中の発現

(1) イネプロトプラストへの形質転換

ベクター-pbet/chl/M2はイネ科植物を形質転換するのに用いられる。すなわち、イネ科植物由来のプロトプラストを液体媒体に懸濁し、電気パルスを印加して当該ベクターを導入した後、イネ培養細胞を含有する培地で培養しコロニーを形成させ、当該コロニーから植物体を再生させる方法である(Shimamoto et al., Nature, 338: 274-276, 1989)。

【0051】プロトプラストは次のようにして調製した。栽培イネ（品種 日本晴）の完熟胚カルスから作製した植え継ぎ後3～5日のサスペンション細胞を、4%セルラーゼRS, 1%マセロザイムR-10, 0.4Mマニトールを含む酵素液(pH5.6)で30℃, 3～4時間処理した。酵素処理終了後、濾過して未消化物を除き、ろ液に4倍量のKMC液(0.118M 塩化カリウム, 0.0817M 塩化マグネシウム, 0.085M 塩化カルシウム, pH6.0；前述の文献参照)を加え、遠心分離して沈降したプロトプラストを集め、更にKMC液で2回洗浄した。

【0052】得られたプロトプラストを、70mM 塩化カリウム, 5mM 塩化マグネシウム, 0.4M マニトール, 0.1% MESを含むpH5.8の緩衝液に8×10<sup>6</sup>個/mlとなるように懸濁した。

【0053】この懸濁液に上記のようにして調製した遺伝子を含むプラスミドベクター60μg/ml並びにプロモーターとしてCaMV35S、外来遺伝子としてハイグロマイシンホスホトランスクレーヴ遺伝子及びNOS(ノバリンシンターゼ)あるいはCaMV由来のターミネーターを有するプラスミド、例えばpGL2(Nature, 338: 274-276, 1989)60μg/mlを添加し、4℃で5分間冷却した後、滅菌したプラスチックセルに移し並行電極を用い、直流の電気パルスを印加した。その際、1000μFのコンデンサーを用いて500V/cmの初期電圧をかけ、パルス幅30msecとした。パルス印加後、4℃で10分間冷却した後、等量のR2/MSプロトプラストアガロース培地(Mol. Gen. Genet., 206, 408, 1987)と混合し、0.7mmの厚さとなるように固化させた。この時の細胞密度は約4×10<sup>6</sup>個/mlであった。

【0054】電気パルス処理したプロトプラストを含むアガロースを10mm大の大きさに切断しR2/MS液体プロトプラスト培地が5ml入った直径6cmのプレートに入れ、更に約100mg(FW)のイネ培養細胞をナース細胞として入れた。プロトプラストの培養は約29℃で約10日間、50rpmの回転でゆっくり振とうしながら、暗条件下で培養した。

【0055】このイネ培養細胞は次のようにして調製した。実生のイネの根に由来するカルスを液体培地で週1回植え継ぎ、作製した懸濁培養細胞中に存在する分裂旺盛な細かい細胞(直径1mm)を用いた。10日間培養後、ナース細胞をKMC液で取り除いた。さらに培養2～4日後に20～30μg/mlとなるようにハイグロマイシンBを培地に加え、2～3週間培養した。

【0056】次いでこのアガロース片をR2ソフトアガーブ地(2,4-ジクロロフェノキシ酢酸(2,4-D)2mg/l, 6%ショ糖, 0.25%アガロース)に置き培養し、2～4週間後、さらに大きくなったコロニーを個々に分けてR2ソフトアガーブ地に移した。このカルスをR2/MS再生培地(3%ソルビトール, 2%ショ糖, 1%アガロース, pH5.8)に移し、25℃, 2,000～4,000luxの条件下で3～10週間培養す

ると、芽及び根が現れた。芽が2cm程度に成長したところで、R2/MS再生培地を入れたプラスチックボックスに移し、幼植物へと成長させた。さらにバーミュキュライトポットに移植して成育させたところ、成熟した完全な形質転換イネ植物体が得られた。

【0057】(2) PCR法による形質転換細胞のスクリーニング

得られたハイグロマイシン耐性カルスの1部からDNAを抽出した(Mol. Gen. Genet., 211, 27, 1988)。直径約2～3mmのカルス2個を1.5mlマイクロ遠心チューブ内でResuspension buffer(20mM Tris-HCl, 10mM EDTA)250μlと共にホモゲナイズし、20% SDSを20μl加えて、68℃15分間加温した。ここに、7.5M Ammonium Acetate 150μlを加えて氷上に3.0分間置いた。15,000 rpm.、4℃、15分間遠心後、上清にエタノール1ml加えて再度同様の条件で遠心してDNAを沈殿させた。得られたDNAを70%EtOHで洗い、乾燥させた後、TE緩衝液(10mM Tris-HCl(pH8.0), 1mM EDTA)30μlに溶かした。

【0058】このDNAをPCR法によるスクリーニングに用いた。5'側プライマーには配列番号1の塩基番号9～26に相当する塩基配列を有するプライマー、及び5'側プライマーには配列番号1の塩基番号1098～1114に相当する塩基配列を有するプライマーを用いた。このプライマーの部位を図5に示す。PCRはプライマー濃度各1μM, 10mM Tris-HCl(pH8.3), 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 50mM KC1, 0.005% Tween 20, 0.005% NP-40, 0.001% ゼラチン, dATP, dGTP, dCTP, dTTP各200μM, 耐熱性DNAポリメラーゼ(REPLIHERM Thermostable DNA Polymerase(EPICENTRE社))5 units、先の方法で調製したDNA5μlを合わせて、全50μlの反応液をDNAサーマルサイクラーPJ1000(PERKIN-ELMER CETUS社)を用いて、94℃, 1分., 50℃, 2分., 72℃, 3分からなるサイクルを、30～35回繰り返し反応させて行った。PCR反応産物を常法のアガロース電気泳動で分析したところ、図6に見られるようにプラスミドpbet/ch1/CM2が組み込まれた形質転換カルスには1.1 kbpの位置に増幅されたDNAが見られた。同様にして多くのハイグロマイシン耐性カルスをスクリーニングした結果、約30%の効率でカルスに導入されていた。

【0059】(3) 導入した遺伝子の転写-mRNAの検出

先にサザン法により全長の遺伝子が導入された形質転換体植物から全mRNAを抽出(Analytical Biochem., 162, 156-159, 1987)し、Oligo-dT kit(宝酒造)を用いてmRNAを抽出した。各mRNA 2μgをノザン法(Thomas, P. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 77, 5201, 1980)で解析した。プローブとしては、配列番号1に示す塩基配列を含む、pbet/ch1/M2のBamHI～NotI断片を用いた。このプローブの位置を図5に示す。その結果、図7に示すように形質転換体植物ではbeta遺伝子から予想される

2.0 KbのmRNAを検出した。遺伝子に改変を加えたプラスミドpBet/chl/M2を導入した形質転換体では、もとのプラスミドpBet/chlを導入したものとの最大1.1倍のmRNAが検出された。

【0060】(4)導入した遺伝子の翻訳—betAタンパク質の検出

大腸菌betAタンパクに対するウサギ抗体を作成し、 Blobelらの方法に従って免疫沈降により<sup>35</sup>Sでラベルした試料中のbetAタンパク質を濃縮し、定法に従ってウェスタン分析をして約60kDaのbetAタンパク質由来のバンドを検出した(図8)。

【0061】(5)導入した遺伝子の翻訳産物のコリン脱水素酵素活性の検出

形質転換体カルスを46.5mM K-リン酸緩衝液(pH 7.4), 10%グリセロール, 5mMジチオスレイトール, 5mM EDTA, 5%ポリビニルピロリドン, 1μM PMSF(フェニルメタノスルフォニルフルオリド), 1μM MIA(モノヨード酢酸)を含む抽出液中で磨碎し10,000rpmで15分遠心分離し上清を得た。これを抽出液中で一晩透析して得られたものを粗抽出液とした。この粗抽出液のタンパク含量を測定し、サンプル間の濃度を揃えたのち、400μlに対し、91mM K-リン酸緩衝液(pH 7.4)300μl, 20mM KCN 50μl, 2mM DCPIP (2, 6-ジクロロフェノールインドフェノールナトリウム塩水和物) 50μl, 2.6mM PMS 50μl加えて混ぜ合わせ26℃で5分放置した後、0.73M塩化コリンを50μl加えて600nmの吸収の減少を2分間測定した。1分間に1μMのDCPIPを還元する酵素量を1unitとして活性値を計算したところ、遺伝子に改変を加えたプラスミドpBet/chl/M2を導入した形質転換体では、もとのプラスミドpBet/chlを導入したものとの最大1.0倍のコリン脱水素酵素活性が検出された(図9)。

【0062】(6)形質転換体植物でのベタインの検出

荒川らの方法(Plant Physiol. 29, 1315-1321 (1988))

配列

ATG CAA TTC GAC TAC ATC ATC GGT	GCC GGG TCA GCG GGC AAC GTT	48
Met Gln Phe Asp Tyr Ile Ile Ile Gly	Ala Gly Ser Ala Gly Asn Val	
1 5 10 15		
CTC GCT ACC CGT CTG ACT GAA GAT CCG	AAT ACC TCC GTG CTG CTG CTT	96
Leu Ala Thr Arg Leu Thr Glu Asp Pro	Asn Thr Ser Val Leu Leu Leu	
20 25 30		
GAA GCG GGC CGC GAC TAT CGC TTT GAC	TTC CGC ACC CAG ATG CCC	144
Glu Ala Gly Gly Pro Asp Tyr Arg Phe	Asp Phe Arg Thr Gln Met Pro	
35 40 45		
GCT GCC CTG GCA TTC CCG CTA CAG GGT	AAA CGC TAC AAC TGG GCC TAT	192
Ala Ala Leu Ala Phe Pro Leu Gln Gly	Lys Arg Tyr Asn Trp Ala Tyr	
50 55 60		
GAA ACG GAA CCT GAA CCG TTT ATG AAC	AAC CGC CGC ATG GAG TGC GGC	240
Glu Thr Glu Pro Glu Pro Phe Met Asn	Asn Arg Arg Met Glu Cys Gly	
65 70 75 80		
CGC GGC AAG GGT CTG GGC GGC TCG	CTG ATC AAC GGC ATG TGC TAC	288

に従い、イネ形質転換植物体からベタインを抽出し、これを過ヨウ素酸塩の形で析出させ重水に溶解し、500MHzの<sup>1</sup>H-NMRを用いてベタインの蓄積を確認した。同時に内部標準として加えたt-ブタノールの量をもとにベタイン含量を定量した。もとのプラスミドpBet/chlを導入した形質転換体植物では全くベタインが検出されなかつたが、遺伝子に改変を加えたプラスミドpBet/chl/M2を導入した形質転換体では1~2μmoles/gFW(FW:新鮮重)のベタインが検出された(図10)。これはベタインを蓄積する耐塩性の強いオオムギの数分の1の蓄積量に相当している。

【0063】

【発明の効果】本発明の大腸菌betAタンパク質をコードする遺伝子は、betAタンパク質をコードし、植物細胞中の遺伝子発現の妨げになるpoly(A)付加シグナル様配列およびパリンドローム配列をのぞいたものであることから、イネ科植物において高発現し、かかる遺伝子を導入して形質転換されたイネ科植物はベタインを生産・蓄積し、高塩類ストレスや乾燥ストレスに耐性のある作物としての有用性が期待される。

【0064】

【配列表】

配列番号: 1

配列の長さ: 1671

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸..Genomic DNAを部分的に改変したもの

配列の特徴

特徴を表す記号: CDS

存在位置: 1..1668

特徴を決定した方法: E

Arg	Gly	Lys	Gly	Leu	Gly	Gly	Ser	Ser	Leu	Ile	Asn	Gly	Met	Cys	Tyr	
85									90				95			
ATC	CGT	GGC	AAT	GCG	CTG	GAT	CTC	GAT	AAC	TGG	GCG	CAA	GAA	CCC	GGT	336
Ile	Arg	Gly	Asn	Ala	Leu	Asp	Leu	Asp	Asn	Trp	Ala	Gln	Glu	Pro	Gly	
100									105				110			
CTG	GAG	AAC	TGG	AGC	TAC	CTC	GAC	TGC	CTG	CCC	TAC	TAC	CGC	AAG	GCC	384
Leu	Glu	Asn	Trp	Ser	Tyr	Leu	Asp	Cys	Leu	Pro	Tyr	Tyr	Arg	Lys	Ala	
115									120				125			
GAG	ACT	CGC	GAT	ATG	GGT	GAA	AAC	GAC	TAT	CAC	GGC	GGT	GAT	GGC	CCG	432
Glu	Thr	Arg	Asp	Met	Gly	Glu	Asn	Asp	Tyr	His	Gly	Gly	Asp	Gly	Pro	
130									135				140			
GTG	AGC	GTC	ACT	ACC	TCC	AAA	CCC	GGC	GTC	AAT	CCG	CTG	TTT	GAA	GCG	480
Val	Ser	Val	Thr	Thr	Ser	Lys	Pro	Gly	Val	Asn	Pro	Leu	Phe	Glu	Ala	
145									150				155			160
ATG	ATT	GAA	GCG	GGC	GTG	CAG	GCG	GGC	TAC	CCG	CGC	ACG	GAC	GAT	CTC	528
Met	Ile	Glu	Ala	Gly	Val	Gln	Ala	Gly	Tyr	Pro	Arg	Thr	Asp	Asp	Leu	
165									170				175			
AAC	GGT	TAT	CAG	CAG	GAA	GGT	TTT	GGT	CCG	ATG	GAT	CCG	ACC	GTC	ACG	576
Asn	Gly	Tyr	Gln	Gln	Glu	Gly	Phe	Gly	Pro	Met	Asp	Arg	Thr	Val	Thr	
180									185				190			
CCG	CAG	GGC	CGT	CGC	GCC	AGC	ACC	GCG	CGT	GGC	TAT	CTC	GAT	CAG	GCC	624
Pro	Gln	Gly	Arg	Arg	Ala	Ser	Thr	Ala	Arg	Gly	Tyr	Leu	Asp	Gln	Ala	
195									200				205			
AAA	TCG	CGT	CCT	AAC	CTG	ACC	ATT	CGT	ACT	CAC	GCT	ATG	ACC	GAT	CAC	672
Lys	Ser	Arg	Pro	Asn	Leu	Thr	Ile	Arg	Thr	His	Ala	Met	Thr	Asp	His	
210									215				220			
ATC	ATT	TTT	GAC	GGC	AAA	CGC	GGC	GTG	GGC	GTC	GAA	TGG	CTG	GAA	GGC	720
Ile	Ile	Phe	Asp	Gly	Arg	Ala	Val	Gly	Val	Glu	Trp	Leu	Glu	Gly		
225									230				235			240
GAC	AGC	ACC	ATC	CCA	ACC	CGC	GCA	ACG	GCC	AAC	AAA	GAA	GTG	CTG	TTA	768
Asp	Ser	Thr	Ile	Pro	Thr	Arg	Ala	Thr	Ala	Asn	Lys	Glu	Val	Leu	Leu	
245									250				255			
TGT	GCA	GGC	GCG	ATT	GCC	TCA	CCG	CAG	ATC	CTG	CAA	CCG	TCC	GGC	GTC	816
Cys	Ala	Gly	Ala	Ile	Ala	Ser	Pro	Gln	Ile	Leu	Gln	Arg	Ser	Gly	Val	
260									265				270			
GGC	AAC	GCT	GAA	CTG	CTG	GCG	GAG	TTT	GAT	ATT	CCG	CTG	GTG	CAT	GAA	864
Gly	Asn	Ala	Glu	Leu	Leu	Ala	Glu	Phe	Asp	Ile	Pro	Leu	Val	His	Glu	
275									280				285			
TTA	CCC	GGC	GTC	GGC	GAA	AAT	CTT	CAG	GAT	CAT	CTG	GAG	ATG	TAT	CTG	912
Leu	Pro	Gly	Val	Gly	Glu	Asn	Leu	Gln	Asp	His	Leu	Glu	Met	Tyr	Leu	
290									295				300			
CAA	TAT	GAG	TGC	AAA	GAA	CCG	GTT	TCC	CTC	TAC	CCT	GCC	CTG	CAG	TGG	960
Gln	Tyr	Glu	Cys	Lys	Glu	Pro	Val	Ser	Leu	Tyr	Pro	Ala	Leu	Gln	Trp	
305									310				315			320
TGG	AAC	CAG	CCG	AAG	ATC	GGC	GGC	GAG	TGG	CTG	TTC	GGC	GGC	ACC	GGC	1008
Trp	Asn	Gln	Pro	Lys	Ile	Gly	Ala	Glu	Trp	Leu	Phe	Gly	Gly	Thr	Gly	
325									330				335			
GTC	GGC	GCC	AGC	AAC	CAC	TTC	GAG	GGC	GGC	GGC	TTC	ATC	CGC	AGC	GGC	1056
Val	Gly	Ala	Ser	Asn	His	Phe	Glu	Ala	Gly	Gly	Phe	Ile	Arg	Ser	Arg	
340									345				350			

GAG GAG TTC GCG TCG CCG AAC ATC CAG TAC CAC TTC CTG CCG GTC GCG	1104
Glu Glu Phe Ala Trp Pro Asn Ile Gln Tyr His Phe Leu Pro Val Ala	
355 360 365	
ATC AAC TAC AAC GGC TCG AAC GCC GTG AAG GAG CAC GGC TTC CAG TGC	1152
Ile Asn Tyr Asn Gly Ser Asn Ala Val Lys Glu His Gly Phe Gln Cys	
370 375 380	
CAC GTC GGC TCA ATG CGC TCG CCA AGC CGT GGG CAT GTG CGG ATT AAA	1200
His Val Gly Ser Met Arg Ser Pro Ser Arg Gly His Val Arg Ile Lys	
385 390 395 400	
TCC CGC GAC CCG CAC CAG CAT CCG GCG ATT CTG TTT AAC TAC ATG TCG	1248
Ser Arg Asp Pro His Gln His Pro Ala Ile Leu Phe Asn Tyr Met Ser	
405 410 415	
CAC GAG CAG GAC TGG CAG GAG TTC CGC GAC GCA ATT CGC ATC ACC CGC	1296
His Glu Gln Asp Trp Gln Glu Phe Arg Asp Ala Ile Arg Ile Thr Arg	
420 425 430	
GAG ATC ATG CAT CAA CCC GCG CTG GAT CAG TAT CGT GGC CGC GAA ATC	1344
Glu Ile Met His Gln Pro Ala Leu Asp Gln Tyr Arg Gly Arg Glu Ile	
435 440 445	
AGC CCC GGT GTC GAA TGC CAG ACG GAT GAA CAG CTC GAT GAG TTC GTG	1392
Ser Pro Gly Val Glu Cys Gln Thr Asp Glu Gln Leu Asp Glu Phe Val	
450 455 460	
CGT AAC CAC GCC GAA ACC GCC TTC CAT CCG TGC GGT ACC TGC AAA ATG	1440
Arg Asn His Ala Glu Thr Ala Phe His Pro Cys Gly Thr Cys Lys Met	
465 470 475 480	
GGT TAC GAC GAG ATG TCC GTG GTT GAC GGC GAA GGC CGC GTA CAC GGG	1488
Gly Tyr Asp Glu Met Ser Val Val Asp Gly Glu Gly Arg Val His Gly	
485 490 495	
TTA GAA GGC CTG CGT GTG GTG GAT GCG TCG ATT ATG CCG CAG ATT ATC	1536
Leu Glu Gly Leu Arg Val Val Asp Ala Ser Ile Met Pro Gln Ile Ile	
500 505 510	
ACC GGG AAT TTG AAC GCC ACG ACA ATT ATG ATT GGC GAG AAA ATA GCG	1584
Thr Gly Asn Leu Asn Ala Thr Thr Ile Met Ile Gly Glu Lys Ile Ala	
515 520 525	
GAT ATG ATT CGT GGA CAG GAA GCG CTG CCG AGG AGC ACG GCG GGA TAT	1632
Asp Met Ile Arg Gly Gln Glu Ala Leu Pro Arg Ser Thr Ala Gly Tyr	
530 535 540	
TTT GTG GCA AAT GGG ATG CCG GTG AGA GCG AAA AAA TGA	1671
Phe Val Ala Asn Gly Met Pro Val Arg Ala Lys Lys	
545 550 555	

【0065】配列番号：2

生物名：大腸菌 (Escherichia coli)

配列の長さ：1710

株名：K-10

配列の型：核酸

配列の特徴

鎖の数：二本鎖

特徴を表す記号：CDS

トポロジー：直鎖状

存在位置：7..1674

配列の種類：Genomic DNA

特徴を決定した方法：E

起源

配列

GGATCC ATG CAA TTT GAC TAC ATC ATT ATT GGT GCC GGC TCA GCC GGC

48

Met Gln Phe Asp Tyr Ile Ile Gly Ala Gly Ser Ala Gly

1

5

10

AAC GTT CTC GCT ACC CGT CTG ACT GAA GAT CCG AAT ACC TCC GTG CTG	96
Asn Val Leu Ala Thr Arg Leu Thr Glu Asp Pro Asn Thr Ser Val Leu	
15 20 25 30	
CTG CTT GAA GCG GGC GGC CCG GAC TAT CGC TTT GAC TTC CGC ACC CAG	144
Leu Leu Glu Ala Gly Gly Pro Asp Tyr Arg Phe Asp Phe Arg Thr Gln	
35 40 45	
ATG CCC GCT GCC CTG GCA TTC CCG CTA CAG GGT AAA CGC TAC AAC TGG	192
Met Pro Ala Ala Leu Ala Phe Pro Leu Gln Gly Lys Arg Tyr Asn Trp	
50 55 60	
GCC TAT GAA ACG GAA CCT GAA CCG TTT ATG AAT AAC CGC CGC ATG GAG	240
Ala Tyr Glu Thr Glu Pro Glu Pro Phe Met Asn Asn Arg Arg Met Glu	
65 70 75	
TGC GGA CGC GGT AAA GGT CTG GGT GGA TCG TCG CTG ATC AAC GGC ATG	288
Cys Gly Arg Gly Lys Gly Leu Gly Gly Ser Ser Leu Ile Asn Gly Met	
80 85 90	
TGC TAC ATC CGT GGC AAT GCG CTG GAT CTC GAT AAC TGG GCG CAA GAA	336
Cys Tyr Ile Arg Gly Asn Ala Leu Asp Leu Asp Asn Trp Ala Gln Glu	
95 100 105 110	
CCC GGT CTG GAG AAC TGG AGC TAC CTC GAC TGC CTG CCC TAC TAC CGC	384
Pro Gly Leu Glu Asn Trp Ser Tyr Leu Asp Cys Leu Pro Tyr Tyr Arg	
115 120 125	
AAG GCC GAG ACT CGC GAT ATG GGT GAA AAC GAC TAT CAC GGC GGT GAT	432
Lys Ala Glu Thr Arg Asp Met Gly Glu Asn Asp Tyr His Gly Gly Asp	
130 135 140	
GGC CCG GTG AGC GTC ACT ACC TCC AAA CCC GGC GTC AAT CCG CTG TTT	480
Gly Pro Val Ser Val Thr Thr Ser Lys Pro Gly Val Asn Pro Leu Phe	
145 150 155	
GAA GCG ATG ATT GAA GCG GGC GTG CAG GCG GGC TAC CCG CGC ACG GAC	528
Glu Ala Met Ile Glu Ala Gly Val Gln Ala Gly Tyr Pro Arg Thr Asp	
160 165 170	
GAT CTC AAC GGT TAT CAG CAG GAA GGT TTT GGT CCG ATG GAT CGC ACC	576
Asp Leu Asn Gly Tyr Gln Gln Glu Gly Phe Gly Pro Met Asp Arg Thr	
175 180 185 190	
GTC ACG CCG CAG GGC CGT CGC GCC AGC ACC GCG CGT GGC TAT CTC GAT	624
Val Thr Pro Gln Gly Arg Arg Ala Ser Thr Ala Arg Gly Tyr Leu Asp	
195 200 205	
CAG GCC AAA TCG CGT CCT AAC CTG ACC ATT CGT ACT CAC GCT ATG ACC	672
Gln Ala Lys Ser Arg Pro Asn Leu Thr Ile Arg Thr His Ala Met Thr	
210 215 220	
GAT CAC ATC ATT TTT GAC GGC AAA CGC GCG GTG GGC GTC GAA TGG CTG	720
Asp His Ile Ile Phe Asp Gly Lys Arg Ala Val Gly Val Glu Trp Leu	
225 230 235	
GAA GGC GAC AGC ACC ATC CCA ACC CGC GCA ACG GCC AAC AAA GAA GTG	768
Glu Gly Asp Ser Thr Ile Pro Thr Arg Ala Thr Ala Asn Lys Glu Val	
240 245 250	
CTG TTA TGT GCA GGC GCG ATT GCC TCA CCG CAG ATC CTG CAA CGC TCC	816
Leu Leu Cys Ala Gly Ala Ile Ala Ser Pro Gln Ile Leu Gln Arg Ser	
255 260 265 270	
GGC GTC GGC AAC GCT GAA CTG CTG GCG GAG TTT GAT ATT CCG CTG GTG	864
Gly Val Gly Asn Ala Glu Leu Leu Ala Glu Phe Asp Ile Pro Leu Val	

275	280	285	
CAT GAA TTA CCC GGC GTC GGC GAA AAT CTT CAG GAT CAT CTG GAG ATG			912
His Glu Leu Pro Gly Val Gly Glu Asn Leu Gln Asp His Leu Glu Met			
290	295	300	
TAT CTG CAA TAT GAG TGC AAA GAA CCG GTT TCC CTC TAC CCT GCC CTG			960
Tyr Leu Gln Tyr Glu Cys Lys Glu Pro Val Ser Leu Tyr Pro Ala Leu			
305	310	315	
CAG TGG TGG AAC CAG CCG AAA ATC GGT GCG GAG TGG CTG TTT GGC GGC			1008
Gln Trp Trp Asn Gln Pro Lys Ile Gly Ala Glu Trp Leu Phe Gly Gly			
320	325	330	
ACT GGC GTT GGT GCC AGC AAC CAC TTT GAA GCA GGT GGA TTT ATT CGC			1056
Thr Gly Val Gly Ala Ser Asn His Phe Glu Ala Gly Gly Phe Ile Arg			
335	340	345	350
AGC CGT GAG GAA TTT GCG TGG CCG AAT ATT CAG TAC CAT TTC CTG CCA			1104
Ser Arg Glu Phe Ala Trp Pro Asn Ile Gln Tyr His Phe Leu Pro			
355	360	365	
GTA GCG ATT AAC TAT AAC GGC TCG AAT GCA GTG AAA GAG CAC GGT TTC			1152
Val Ala Ile Asn Tyr Asn Gly Ser Asn Ala Val Lys Glu His Gly Phe			
370	375	380	
CAG TGC CAC GTC GGC TCA ATG CGC TCG CCA AGC CGT GGG CAT GTG CGG			1200
Gln Cys His Val Gly Ser Met Arg Ser Pro Ser Arg Gly His Val Arg			
385	390	395	
ATT AAA TCC CGC GAC CCG CAC CAG CAT CCG GCG ATT CTG TTT AAC TAC			1248
Ile Lys Ser Arg Asp Pro His Gln His Pro Ala Ile Leu Phe Asn Tyr			
400	405	410	
ATG TCG CAC GAG CAG GAC TGG CAG GAG TTC CGC GAC GCA ATT CGC ATC			1296
Met Ser His Glu Gln Asp Trp Gln Glu Phe Arg Asp Ala Ile Arg Ile			
415	420	425	430
ACC CGC GAG ATC ATG CAT CAA CCC GCG CTG GAT CAG TAT CGT GGC CGC			1344
Thr Arg Glu Ile Met His Gln Pro Ala Leu Asp Gln Tyr Arg Gly Arg			
435	440	445	
GAA ATC AGC CCC GGT GTC GAA TGC CAG ACG GAT GAA CAG CTC GAT GAG			1392
Glu Ile Ser Pro Gly Val Glu Cys Gln Thr Asp Glu Gln Leu Asp Glu			
450	455	460	
TTC GTG CGT AAC CAC GCC GAA ACC GCC TTC CAT CCG TGC GGT ACC TGC			1440
Phe Val Arg Asn His Ala Glu Thr Ala Phe His Pro Cys Gly Thr Cys			
465	470	475	
AAA ATG GGT TAC GAC GAG ATG TCC GTG GTT GAC GGC GAA GGC CGC GTA			1488
Lys Met Gly Tyr Asp Glu Met Ser Val Val Asp Gly Glu Gly Arg Val			
480	485	490	
CAC GGG TTA GAA GGC CTG CGT GTG GAT GCG TCG ATT ATG CCG CAG			1536
His Gly Leu Glu Gly Leu Arg Val Val Asp Ala Ser Ile Met Pro Gln			
495	500	505	510
ATT ATC ACC GGG AAT TTG AAC GCC ACG ACA ATT ATG ATT GGC GAG AAA			1584
Ile Ile Thr Gly Asn Leu Asn Ala Thr Thr Ile Met Ile Gly Glu Lys			
515	520	525	
ATA GCG GAT ATG ATT CGT GGA CAG GAA GCG CTG CCG AGG AGC ACG GCG			1632
Ile Ala Asp Met Ile Arg Gly Gln Glu Ala Leu Pro Arg Ser Thr Ala			
530	535	540	
GGA TAT TTT GTG GCA AAT GGG ATG CCG GTG AGA GCG AAA AAA			1674

Gly Tyr Phe Val Ala Asn Gly Met Pro Val Arg Ala Lys Lys

545

550

555

TGAGTCGTGA TGTGAACCAA CGCAGGAACC GAGCTC

1710

【0066】配列番号：3

配列の長さ：556

配列の型：アミノ酸

トボロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

配列

Met Gln Phe Asp Tyr Ile Ile Ile Gly Ala Gly Ser Ala Gly Asn Val  
1 5 10 15

Leu Ala Thr Arg Leu Thr Glu Asp Pro Asn Thr Ser Val Leu Leu Leu  
20 25 30

Glu Ala Gly Gly Pro Asp Tyr Arg Phe Asp Phe Arg Thr Gln Met Pro  
35 40 45

Ala Ala Leu Ala Phe Pro Leu Gln Gly Lys Arg Tyr Asn Trp Ala Tyr  
50 55 60

Glu Thr Glu Pro Glu Pro Phe Met Asn Asn Arg Arg Met Glu Cys Gly  
65 70 75 80

) Arg Gly Lys Gly Leu Gly Gly Ser Ser Leu Ile Asn Gly Met Cys Tyr  
85 90 95

Ile Arg Gly Asn Ala Leu Asp Leu Asp Asn Trp Ala Gln Glu Pro Gly  
100 105 110

Leu Glu Asn Trp Ser Tyr Leu Asp Cys Leu Pro Tyr Tyr Arg Lys Ala  
115 120 125

Glu Thr Arg Asp Met Gly Glu Asn Asp Tyr His Gly Gly Asp Gly Pro  
130 135 140

Val Ser Val Thr Thr Ser Lys Pro Gly Val Asn Pro Leu Phe Glu Ala  
145 150 155 160

) Met Ile Glu Ala Gly Val Gln Ala Gly Tyr Pro Arg Thr Asp Asp Leu  
165 170 175

Asn Gly Tyr Gln Gln Glu Gly Phe Gly Pro Met Asp Arg Thr Val Thr  
180 185 190

Pro Gln Gly Arg Arg Ala Ser Thr Ala Arg Gly Tyr Leu Asp Gln Ala  
195 200 205

) Lys Ser Arg Pro Asn Leu Thr Ile Arg Thr His Ala Met Thr Asp His  
210 215 220

Ile Ile Phe Asp Gly Lys Arg Ala Val Gly Val Glu Trp Leu Glu Gly  
225 230 235 240

Asp Ser Thr Ile Pro Thr Arg Ala Thr Ala Asn Lys Glu Val Leu Leu  
245 250 255

Cys Ala Gly Ala Ile Ala Ser Pro Gln Ile Leu Gln Arg Ser Gly Val  
260 265 270

Gly Asn Ala Glu Leu Leu Ala Glu Phe Asp Ile Pro Leu Val His Glu  
275 280 285

Leu Pro Gly Val Gly Glu Asn Leu Gln Asp His Leu Glu Met Tyr Leu  
290 295 300

Gln Tyr Glu Cys Lys Glu Pro Val Ser Leu Tyr Pro Ala Leu Gln Trp  
305 310 315 320

Trp Asn Gln Pro Lys Ile Gly Ala Glu Trp Leu Phe Gly Gly Thr Gly  
325 330 335

Val Gly Ala Ser Asn His Phe Glu Ala Gly Gly Phe Ile Arg Ser Arg

340	345	350													
Glu	Glu	Phe	Ala	Trp	Pro	Asn	Ile	Gln	Tyr	His	Phe	Leu	Pro	Val	Ala
355	360	365													
Ile	Asn	Tyr	Asn	Gly	Ser	Asn	Ala	Val	Lys	Glu	His	Gly	Phe	Gln	Cys
370	375	380													
His	Val	Gly	Ser	Met	Arg	Ser	Pro	Ser	Arg	Gly	His	Val	Arg	Ile	Lys
385	390	395	400												
Ser	Arg	Asp	Pro	His	Gln	His	Pro	Ala	Ile	Leu	Phe	Asn	Tyr	Met	Ser
405	410	415													
His	Glu	Gln	Asp	Trp	Gln	Glu	Phe	Arg	Asp	Ala	Ile	Arg	Ile	Thr	Arg
420	425	430													
Glu	Ile	Met	His	Gln	Pro	Ala	Leu	Asp	Gln	Tyr	Arg	Gly	Arg	Glu	Ile
435	440	445													
Ser	Pro	Gly	Val	Glu	Cys	Gln	Thr	Asp	Glu	Gln	Leu	Asp	Glu	Phe	Val
450	455	460													
Arg	Asn	His	Ala	Glu	Thr	Ala	Phe	His	Pro	Cys	Gly	Thr	Cys	Lys	Met
465	470	475	480												
Gly	Tyr	Asp	Glu	Met	Ser	Val	Val	Asp	Gly	Glu	Gly	Arg	Val	His	Gly
485	490	495													
Leu	Glu	Gly	Leu	Arg	Val	Val	Asp	Ala	Ser	Ile	Met	Pro	Gln	Ile	Ile
500	505	510													
Thr	Gly	Asn	Leu	Asn	Ala	Thr	Thr	Ile	Met	Ile	Gly	Glu	Lys	Ile	Ala
515	520	525													
Asp	Met	Ile	Arg	Gly	Gln	Glu	Ala	Leu	Pro	Arg	Ser	Thr	Ala	Gly	Tyr
530	535	540													
Phe	Val	Ala	Asn	Gly	Met	Pro	Val	Arg	Ala	Lys	Lys				
545	550	555													

【0067】配列番号：4

配列の長さ：306

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列の特徴

特徴を表す記号：CDS

存在位置：1..306

特徴を決定した方法：E

## 配列

AGGGTGTATGG	GATCCATGCA	ATTCCACTAC	ATCATCATCG	GTGCCGGTC	AGCCGGCAAC	60
GTTCCTCGCTA	CCCGTCTGAC	TGAAGATCCG	AATACCTCCG	TGCTGCTGCT	TGAAGCGGGC	120
GGCCCGGACT	ATCGCTTTGA	CTTCCGCAAC	CAGATCCCCG	CTGCCCTGGC	ATTCCCGCTA	180
CAGGGTAAAC	GCTACAACTG	GGCCTATGAA	ACCGAACCTG	AACCGTTAT	GAACAACCGC	240
CGCATGGAGT	CGGGCCGCGG	CAAGGGTCTG	GGCGGCTCGT	CGCTGATCAA	CGGCATGTGC	300
TACATC						306

【0068】配列番号：5

配列の長さ：238

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列の特徴

特徴を表す記号：CDS

存在位置：1..238

特徴を決定した方法：E

## 配列

GGTTCCCTC	TACCTGCC	TGCAGTGGTG	GAACCAGCCG	AAGATCGGCG	CGGAGTGGCT	60
GTTCGGCGGC	ACCGGCGTCC	GCGCCAGCAA	CCACTTCGAG	GCGGGCGGCT	TCATCCGCAG	120
CCGGCAGGAG	TTCCGCTGGC	CGAACATCCA	GTACCACTTC	CTGCCGGTCG	CGATCAACTA	180
CAACGGCTCG	AACGCCGTGA	AGGAGCACCG	CTTCCAGTGC	CACGCCGGCT	CAATGCGC	238

【0069】配列番号：6

配列の長さ：63

配列の型：核酸  
鎖の数：二本鎖  
トポロジー：直鎖状  
配列の種類：合成DNA

## 配列

ATGGGATCCA TGCAATTGCA CTACATCATC ATCGGTGCCG GGTCAGCGGG CAACGTTCTC 60  
GCT 63

【0070】配列番号：7

配列の長さ：63  
配列の型：核酸  
鎖の数：二本鎖  
トポロジー：直鎖状

## 配列

TTGATCAGCG ACCAGCCGCC CAGACCCCTTG CCCGGGCCGC ACTCCATGCG GCGGTTGTT 60  
ATA 63

【0071】配列番号：8

配列の長さ：85  
配列の型：核酸  
鎖の数：二本鎖  
トポロジー：直鎖状

## 配列

CTCTACCCCTG CCCTGCAGTG GTGGAACCAAG CCGAAGATCG GCGCGGAGTG GCTGTTCGGC 60  
GGCACCGGCG TCGGCGCCAG CAACC 85

【0072】配列番号：9

配列の長さ：85  
配列の型：核酸  
鎖の数：二本鎖  
トポロジー：直鎖状

## 配列

TCGGCGCCAG CAACCACTTC GAGGCGGGCG GCTTCATCCG CAGCCGCGAG GAGTTCGCGT 60  
GGCCGAACAT CCAGTACCAAC TTCCCT 85

【0073】配列番号：10

配列の長さ：85  
配列の型：核酸  
鎖の数：二本鎖  
トポロジー：直鎖状

## 配列

TGGAGCCGAC GTGGCACTGG AAGCCGTGCT CCTTCACGGC GTTCGAGCCG TTGTAGTTGA 60  
TCGGGACCGG CAGGAAGTGG TACTG 85

## 【画面の簡単な説明】

【図1】 プラスミドpbet/ch1/M1を構築する過程を示す図。P Rはカリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーター、I N Tはヒマカタラーゼ遺伝子第1イントロン、T e r mはノバリンシンターゼ遺伝子ターミネーターを表す。

【図2】 プラスミドpBS/ch1/M1を構築する過程を示す図。

【図3】 プラスミドpBS/bet/M2を構築する過程を示す図。

【図4】 プラスミドpbet/ch1/M2を構築する過程を示す図。

配列の特徴  
特徴を表す記号：CDS  
存在位置：1..63  
特徴を決定した方法：E

配列の種類：合成DNA  
配列の特徴  
特徴を表す記号：CDS  
存在位置：1..63  
特徴を決定した方法：E

配列の種類：合成DNA  
配列の特徴  
特徴を表す記号：CDS  
存在位置：1..85  
特徴を決定した方法：E

配列の種類：合成DNA  
配列の特徴  
特徴を表す記号：CDS  
存在位置：1..85  
特徴を決定した方法：E

## す図。

【図5】 ハイグロマイシン耐性カルスから抽出したDNAのスクリーニングに用いたPCR用プライマーと、改変型betA遺伝子配列との対応を、及びbetA遺伝子転写産物の検出に用いたノザン法用プローブと、改変型betA遺伝子配列との対応を示す図。

【図6】 PCRによるハイグロマイシン耐性カルスのスクリーニングの結果を示す図（電気泳動写真）。

【図7】 ノザン法によるbetA遺伝子転写産物の検出の結果を示す図（電気泳動写真）。レーン1はコントロール（キヌヒカリ）、レーン2はpbet/ch1で形質転換され

たイネ細胞、レーン3～8はpbet/chl/M2で形質転換されたイネ細胞。

【図8】 大腸菌betAタンパクに対するウサギ抗体を用いたウェスタン分析によるbetA遺伝子翻訳産物の検出の結果を示す図（電気泳動写真）。レーン1は25μlの抗体とインキュベートしたC-238、レーン2は50μlの抗体とインキュベートしたC-238。

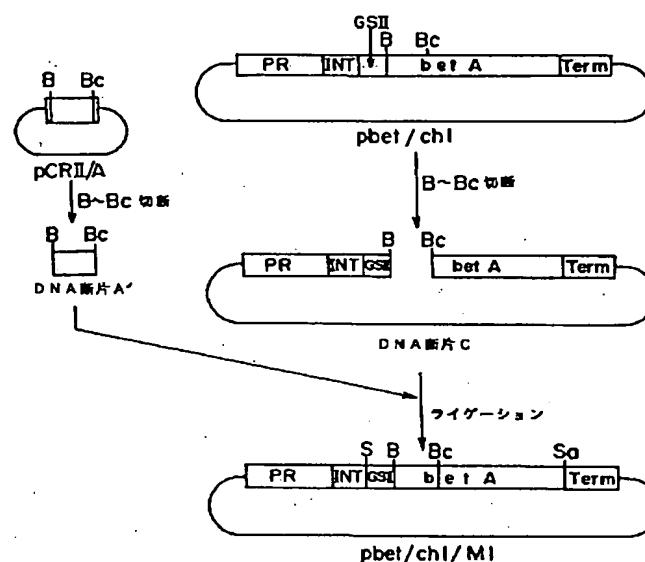
【図9】 形質転換植物のコリン脱水素酵素活性を示す図。

【図10】 形質転換植物のベタイン蓄積量を示す図。

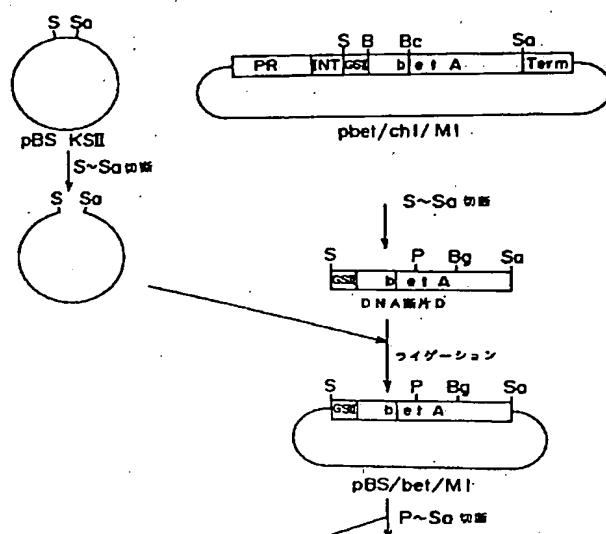
【符号の説明】

B : Bam HI  
Bc : Bcl I  
Bg : Bgl I  
S : Sal I  
Sa : Sac I  
P : Pst I

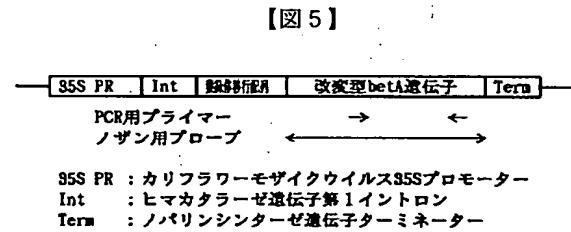
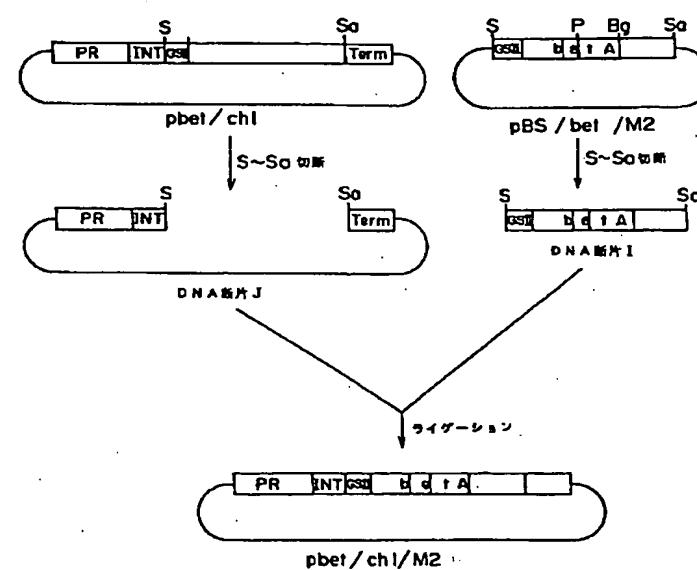
【図1】



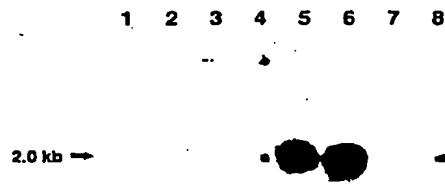
【図2】



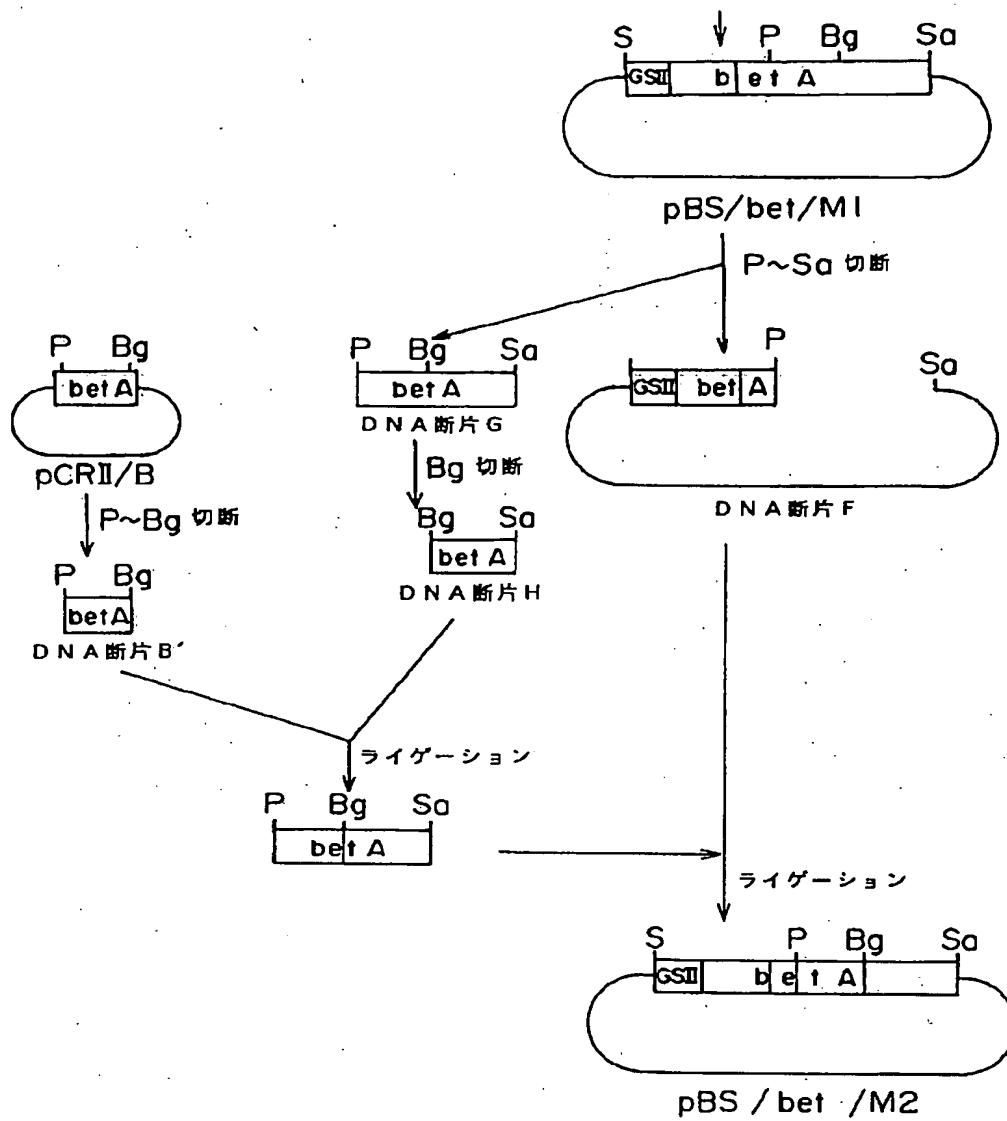
【図4】



【図7】



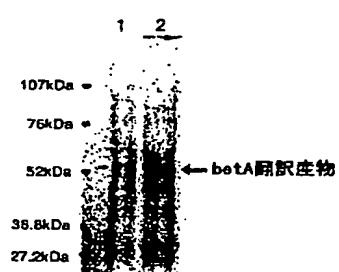
【図3】



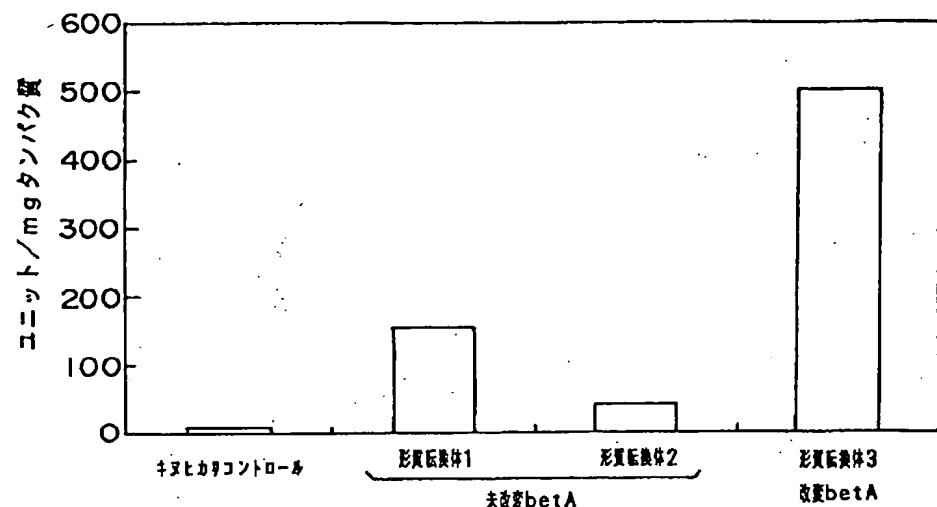
【図6】



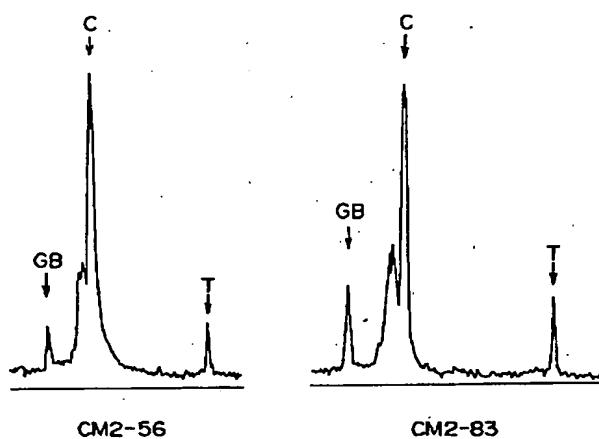
【図8】



【図9】



【図10】



フロントページの続き

(51) Int.Cl. 6 識別記号 F I  
 C 1 2 Q 1/68 C 1 2 N 5/00 C  
 // (C 1 2 N 15/09 Z N A  
 C 1 2 R 1:19)  
 (C 1 2 P 21/02  
 C 1 2 R 1:91)

(72) 発明者 田中 章  
 神奈川県横浜市鶴志田町1000番地 株式会  
 社植物工学研究所内